

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19703

研究課題名(和文) 間葉系細胞による微細環境制御を活用したヒト毛包再生促進技術の開発

研究課題名(英文) Development of folliclogenetic technique utilizing mesenchymal cells capable of controlling microenvironment

研究代表者

木下 美咲 (Kinoshita, Misaki)

杏林大学・医学部・専攻医

研究者番号：40594594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：毛包の再生にはその周囲の環境が重要と考えられている。本研究ではその環境を制御することでヒト毛包再生に有利な条件の確立を試みた。まず、毛包の再生にとって重要なWNTシグナル経路の刺激をヒトの毛包周囲から分離・培養した線維芽細胞に与えると、細胞増殖因子であるFGFファミリーのうちFGF9の上昇やFGF7の低下といった変化が毛包を構成する細胞に作用し毛包の再生に有利な条件をつくり出すことがわかった。ヌードマウスを用いた毛包再生実験ではFGF9を加えることで毛包の再生が促進され、毛包のサイズや数が増えた。本研究の結果は、ヒトの毛包再生技術の確立の一助となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：State of microenvironment affects the efficiency of hair follicle (HF) induction. In this study, we sought for a methodology to support human HF regeneration by regulating surrounding microenvironment. First, we confirmed that human-scalp derived fibroblasts (hsFBs) demonstrate unique FGF expression pattern and possess the capacity to modulate the profile in response to WNT activation represented by up-regulation of FGF9 and down-regulation of FGF7. Supplementation of these FGFs to HF composing cells resulted in significant alteration in representative HF marker gene expression. When FGF9 was administered to subcutaneously into immunodeficient mice, co-transplanted with mice epidermal and dermal cells, acceleration of HF induction and increase in the number and the diameter of newly formed HFs were observed. These results suggest that hsFBs may support HF formation by modulating FGF expression profile in response to regional WNT cue which can be utilized for human HF regeneration.

研究分野：毛髪疾患

キーワード：毛包再生 毛包新生 線維芽細胞 毛乳頭細胞 FGF WNTシグナル

1. 研究開始当初の背景

毛髪は個人のイメージを形成し社会生活、精神状態に強く影響を与し得るファクターの一つであり、脱毛症状や毛髪疾患に対する治療のニーズは高い。瘢痕性脱毛症など毛包構造の非可逆的な破壊を伴う脱毛症ではヒト毛包を再生し移植することが唯一の治療法となるが、現時点で安定したヒト毛包再生技術は確立されていない。マウスでは、上皮系細胞と間葉系細胞を免疫不全マウスに共移植することで毛包構造を再現することができるが (Weinberg WC, et al. J Invest Dermatol 1993)、ヒト細胞を用いての毛包構造の再現は困難であった。その原因の一つとして毛包再生に必要な上皮-間葉系の相互作用が十分に機能していない可能性が考えられる。そこでヒト上皮、間葉系の細胞の特性を毛包再生に向けて強化しようと取り組みが今までになされてきた (Ohyama M, et al. J Dermatol Sci 2013)。上皮-間葉系細胞間相互作用が成立するためには介在するシグナル因子やサイトカインが必須だが、中でも特に重要と考えられているのが WNT シグナルおよび線維芽細胞増殖因子 (FGF; fibroblast growth factor) である。23 種類存在する FGF のうち複数の FGF の毛包再生・新生・成長における役割が主にマウスを対象とした研究で報告されており (Imamura T. Biol Pharm Bull 2014)、その作用の多くは WNT シグナルによりコントロールされることが判明している。特に近年、遺伝子改変マウスを用いた研究で毛包を取りまく真皮線維芽細胞が FGF9 を分泌することにより局所の WNT シグナルを活性化させ毛包再生を促進することが報告された (Gay D, et al. Nat Med 2013)。この所見はヒトでも間葉系細胞を同様に機能させ毛包再生を促す微細環境を構築できる可能性を示唆している。従来、申請者らの研究室ではヒト毛包細胞を用いた各種毛包再生モデルの作成に取り組んできた。そこでヒト頭皮由来間葉系細胞を用いて WNT シグナル刺激を介した FGF 発現変化により微細環境を制御することで、ヒト毛包再生を促進する技術の開発を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト間葉系細胞の局所シグナル変化に応答したサイトカイン発現が毛包構成細胞に与える変化を利用し、毛包再生に最適な微細環境の誘導・形成に導くことで、現在では実現困難なヒト毛包再生実現に向けての技術的基盤の確立を目指すことである。具体的にはヒト頭皮由来線維芽細胞が毛包発生に重要なシグナル分子である WNT シグナルの活性化シグナルをうけた際の FGF 発現プロファイルの変化に注目し、その変化を毛包再構成モデルに反映することで毛包再生効率が改善するか否かにつき検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト頭皮由来毛包構成細胞および線維芽

細胞の単離・培養

ヒト健常頭皮より得られた余剰皮膚より、すでに確立し本研究室で実践されている手法 (Ohyama M, et al. Exp Dermatol 2010) を用いてケラチノサイト、毛乳頭細胞、結合織性毛根鞘細胞、線維芽細胞を単離し、継代培養を行った (図 1)。

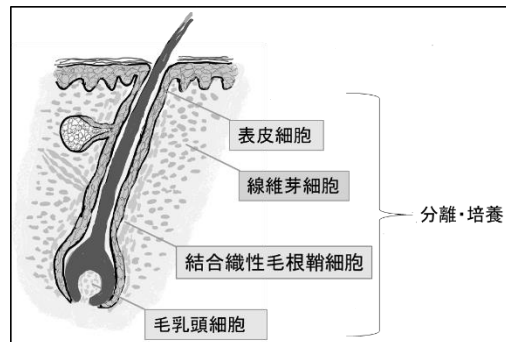


図 1 毛包構成細胞および線維芽細胞のシェーマ図 ヒト健常頭皮よりこれら 4 種の細胞を分離し個別に培養の上、本研究で使用した。

(2) ヒト頭皮由来間葉系細胞における各 FGF 発現プロファイリングの作成

(1) で得られた毛乳頭細胞、結合織性毛根鞘細胞、線維芽細胞よりそれぞれ total RNA を抽出し、PCR によりヒト FGF23 種のうち毛包に関連した作用が報告されている代表的なものの発現を解析した。

(3) WNT シグナル活性化による線維芽細胞での FGF 発現変化の検討

線維芽細胞を WNT シグナル活性化因子である CHIR99021 の添加条件下で 1 週間単独培養し、CHIR99021 添加群、非添加群における代表的 FGF の発現をリアルタイム PCR で解析した。さらに FGF7, 9 に関しては添加する CHIR99021 の濃度依存性の変化を評価した。また CHIR99021 添加群、非添加群のヒト皮膚由来線維芽細胞における FGF7, 9 発現の差をタンパクレベルで評価するため、ウエスタンブロットを行った。

(4) 代表的 FGF 添加条件下での毛包構成細胞におけるマーカー遺伝子発現変化の検討

FGF7 または 9 を添加した条件下で毛乳頭細胞、ケラチノサイトの単独培養もしくは両者の共培養を行い、各細胞における重要マーカー遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR で評価した。

(5) *In vivo* での代表的 FGF の毛包再生効果の検討

免疫不全マウスの背部皮下に、シリコンチャンバーを移植し、マウス胎児皮膚より分離した真皮細胞、表皮細胞を混合移植の上、その後 2 週間、FGF7 もしくは 9 を隔日で添加し、チャンバー除去後に再生された上皮における毛包再生効果を組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト頭皮由来間葉系細胞における FGF 発現パターンと線維芽細胞における特異性
3 種の間葉系細胞における FGF 発現パターンを図 2 に示す。結合織性外毛根鞘細胞では FGF10、毛乳頭細胞では FGF7 の発現が相対的に高いことが示された。線維芽細胞では毛包の退行期への移行に関わるとされる FGF5 や休止期の維持に重要と考えられている FGF18 (Imamura T. Biol Pharm Bull 2014) など、毛周期に対し抑制的に関与する FGF の相対的な発現上昇がみられ、他 2 種の間葉系細胞に比して特異的な発現プロファイルを呈した。

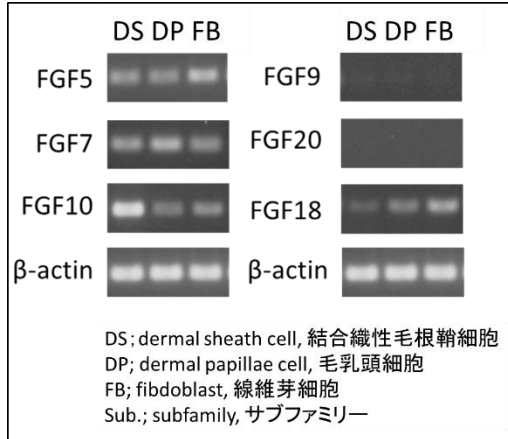


図 2 各毛包由来間葉系細胞における各 FGF 発現パターン 線維芽細胞では FGF5, 18 の相対的な発現上昇が確認された (代表的実験結果を示す)。

(2) WNT シグナル活性化によるヒト頭皮由来線維芽細胞での FGF 発現パターンの変化
CHIR99021 添加下で 1 週間培養すると、線維芽細胞の形態が変化した (図 3)。

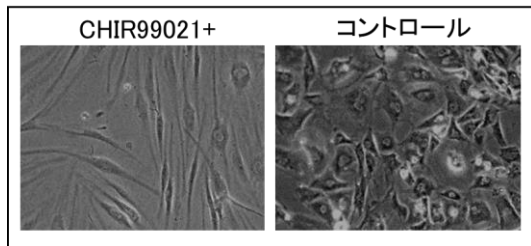


図 3 CHIR 添加による線維芽細胞の形態変化
1 週間の CHIR99021 添加による WNT 活性化条件下で線維芽細胞の明らかな形態変化が確認される。

CHIR99021 添加群での代表的 FGF の発現を非添加群と比較したところ、癒痕皮膚における毛包再生効果が報告されている (Gay D, et al. Nat Med 2013) FGF9 の発現が有意に上昇し、FGF9 と同サブファミリーに属する FGF20 の発現も上昇することが分かった。一方で、毛包誘導の抑制効果が報告されている (Richardson GD, et al. Development 2009) FGF7 では著明な発現低下が確認された (図 4)。また FGF7, 9 については、その発現変化が

CHIR99021 の濃度に依存することが示された。またウエスタンブロットにより発現変化がタンパクレベルでも確認された。

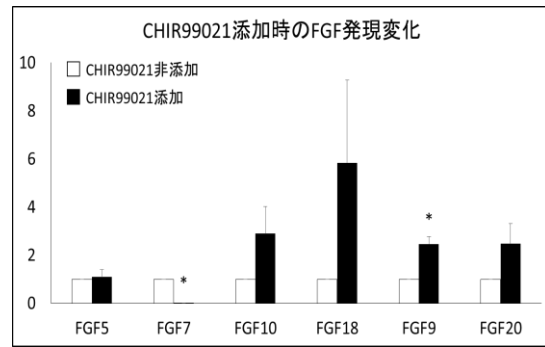


図 4 WNT 活性化による FGF の発現変化 CHIR99021 添加群で FGF9 の有意な発現上昇ならびに FGF7 の有意な発現低下が示された (代表的実験結果を示す)。

(3) FGF7, 9 添加による毛乳頭細胞ならびにケラチノサイトでのマーカー遺伝子発現変化
毛乳頭細胞では FGF9 添加時に、SPRY4 の有意な発現上昇に代表されるようにいくつかの重要マーカー遺伝子の上昇を認め、その傾向はケラチノサイトとの共培養時にも確認された (図 5)。

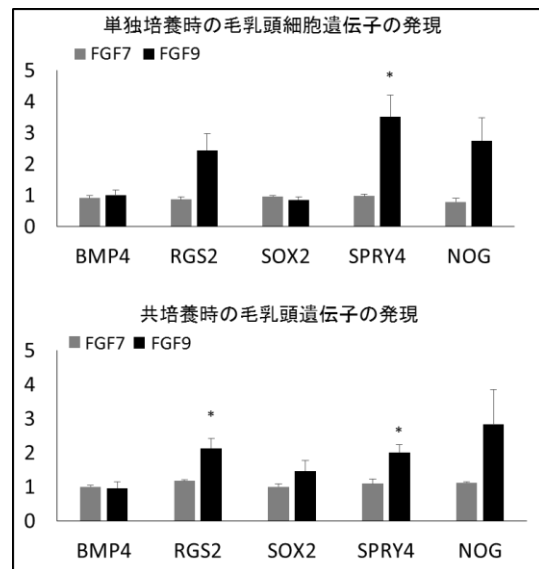


図 5 単独培養時および共培養時の毛乳頭細胞における代表的マーカー遺伝子の発現変化 FGF9 添加時に複数の遺伝子の発現が上昇し同様の傾向がケラチノサイトとの共培養時にも確認された (代表的実験結果を示す)。

一方でケラチノサイトの単独培養時には FGF7, FGF9 添加群のいずれにおいても有意な遺伝子変化が確認されなかったのに対し、毛乳頭細胞との共培養時には FGF9 添加時の TRPS1 の有意な発現上昇や FGF7 添加時の KRT75 の有意な発現低下が確認され、FGF が毛包構成細胞に作用する際に上皮-間葉系細胞の相互作用が重要であることが示唆された (図 6)。

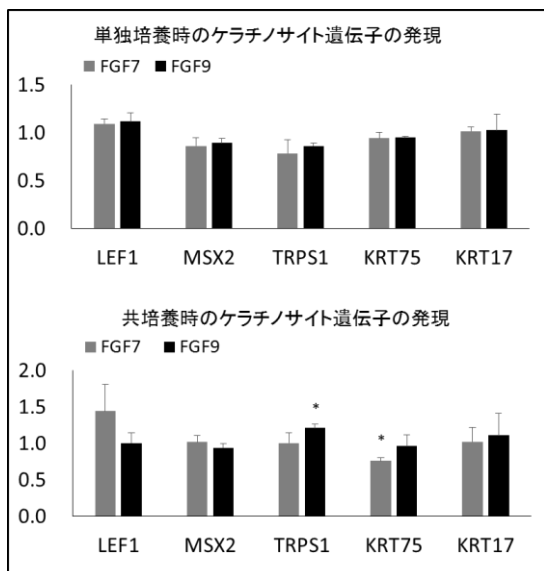


図6 単独培養時および共培養時のケラチノサイトにおける代表的マーカー遺伝子の発現変化。毛乳頭細胞との共培養時にのみ重要遺伝子のいくつかに有意な発現変化が認められた(代表的実験結果を示す)。

(4) FGF7, 9 投与による *in vivo* での毛包再生効果

チャンバー除去部位の皮膚欠損部における上皮化および毛包再生の過程を継時的に観察したところ、いずれの群でも上皮化皮膚に明らかかな毛の再生みられたが、FGF9 群では他群に比して早期に再生が確認された(図7)。

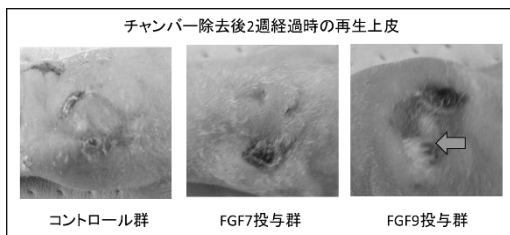


図7 チャンバー除去後2週経過時の上皮化皮膚にみられる毛包再生。FGF9 群にのみ、この時点で明らかかな再生毛(矢印)が確認できる。

チャンバー除去後4週経過時の組織学的解析で FGF9 群は一定面積内の再生毛包数および平均毛包直径数ともにコントロール群を有意に上回ったのに対し、FGF7 群では平均毛包直径がコントロール群より有意に小さかった(図8)。

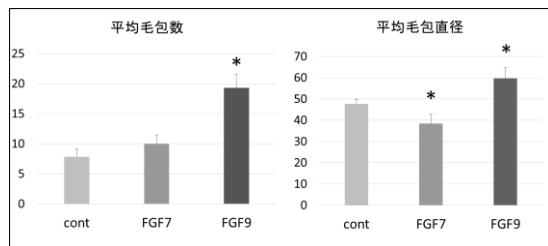


図8 各群の再生毛包数および平均毛包直径。FGF9 投与群で有意な再生毛包数の増加および平均毛包直径の太径化が確認され、FGF7 投与

群の有意な毛包直径の細径化が認められた。

以上の結果から、ヒト頭皮由来線維芽細胞は局所の WNT シグナル活性化に反応し、FGF 発現プロファイルを変化させること、その変化は上皮-間葉系細胞間に作用し実際に毛包誘導に促進的な微細環境形成に寄与することが示唆された。ヒト頭皮由来線維芽細胞で起きる変化が毛包誘導に与える影響をさらに厳密に検証するためには、WNT シグナル以外のシグナル経路の影響や FGF7, 9 以外の FGF および複数の FGF が相乗的に毛包再生に与える効果の検討、ヒト由来毛包構成細胞・線維芽細胞を用いた *in vivo* での毛包再生効果の解析などが必要ではあるものの、本研究はヒト頭皮由来間葉系細胞による微細環境の制御を通してヒト毛包再生促進技術の確立の一助となったといえる。

<引用文献>

- Weinberg WC, Goodman LV, George C, Morgan DL, Ledbetter S, Yuspa SH, et al. Reconstitution of hair follicle development in vivo: determination of follicle formation, hair growth, and hair quality by dermal cells. *The Journal of investigative dermatology*. 1993;100; 229-236.
- Ohyama M, Veraitch O. Strategies to enhance epithelial-mesenchymal interactions for human hair follicle bioengineering. *Journal of dermatological science*. 2013;70; 78-87.
- Gay D, Kwon O, Zhang Z, Spata M, Plikus MV, Holler PD, et al. Fgf9 from dermal gammadelta T cells induces hair follicle neogenesis after wounding. *Nature medicine*. 2013;19; 916-923.
- Ohyama M, Zheng Y, Paus R, Stenn KS. The mesenchymal component of hair follicle neogenesis: background, methods and molecular characterization. *Experimental dermatology*. 2010;19; 89-99.
- Imamura T. Physiological functions and underlying mechanisms of fibroblast growth factor (FGF) family members: recent findings and implications for their pharmacological application. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2014;37; 1081-1089.

⑥ Richardson GD, Bazzi H, Fantauzzo KA, Waters JM, Crawford H, Hynd P, et al. KGF and EGF signalling block hair follicle induction and promote interfollicular epidermal fate in developing mouse skin. Development. 2009;136; 2153-2164.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

① Misaki Kinoshita-Ise, Aki Tsukashima, Tomonari Kinoshita, Yoshimi Yamazaki, Manabu Ohyama
Human scalp-derived fibroblasts alter FGF expression profile upon WNT activation: implication of their role to provide folliculogenetic microenvironment
76th SID annual meeting
2017 年 4 月 26 日～4 月 29 日
Portland, USA

② 木下 美咲、塚島 明希、木下 智成、山崎好美、大山 学
ヒト線維芽細胞における WNT シグナル活性化時の FGF 発現プロファイル変化とその毛包再生促進効果の検討
第 16 回日本再生医療学会
2017 年 3 月 9 日 仙台国際センター(宮城・仙台)

[その他]

ホームページ等

[http://www.kyorin-](http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/dermatology/)

[u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/dermatology/](http://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/dermatology/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 美咲 (KINOSHITA MISAKI)
杏林大学・医学部・専攻医
研究者番号：40594594

(2) 研究協力者

大山 学 (OHYAMA MANABU)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号：1025542

塚島 明希 (TSUKASHIMA AKI)
杏林大学・医学部・実験助手